

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP03/12428

| | |
|-------------------|-----|
| REC'D 18 FEB 2004 | |
| WIPO | PCT |

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 51 879.3

Anmeldetag: 07. November 2002

Anmelder/Inhaber: CellControl Biomedical Laboratories AG,
Planegg/DE

Bezeichnung: Medium und Verfahren zur Messung der
Wirksamkeit einer Tumorthherapie

IPC: C 12 Q 1/02

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 17. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Werner

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)

WEICKMANN & WEICKMANN

Patentanwälte
European Patent Attorneys · European Trademark Attorneys

DIPL.-ING. **H. WEICKMANN** (bis 31.1.01)
DIPL.-ING. **F. A. WEICKMANN**
DIPL.-CHEM. **B. HUBER**
DR.-ING. **H. LISKA**
DIPL.-PHYS. DR. **J. PRECHTEL**
DIPL.-CHEM. DR. **B. BÖHM**
DIPL.-CHEM. DR. **W. WEISS**
DIPL.-PHYS. DR. **J. TIESMEYER**
DIPL.-PHYS. DR. **M. HERZOG**
DIPL.-PHYS. **B. RUTTENSPERGER**
DIPL.-PHYS. DR.-ING. **V. JORDAN**
DIPL.-CHEM. DR. **M. DEY**
DIPL.-FORSTW. DR. **J. LACHNIT**

Unser Zeichen:
29307P DE/HBwr

Anmelder:
**CellControl Biomedical
Laboratories AG
Am Klopferspitz 19**

82152 Martinsried

Medium und Verfahren zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie

Medium und Verfahren zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein Medium zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie an Einzelzellsuspensionen sowie ein Verfahren zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie unter Verwendung dieses Mediums.

10

Um die Wirksamkeit von Tumorthapien zu testen, wäre es wünschenswert, an einer isolierten Tumorzelle den Einfluss einer Tumorthherapie auf die Lebensfähigkeit dieser Zelle bestimmen zu können. Ein solches Verfahren würde es ermöglichen, bei einem Patienten vorab festzustellen, ob eine bestimmte Therapie bei seinem speziellen Tumor wirksam ist oder nicht. Hierzu wären Tumorteile zu entnehmen, durch enzymatischen Verdau in eine Einzelzellsuspension zu überführen und dann die Lebenstätigkeit der so erhaltenen Einzelzellen unter dem Einfluss der Therapie, typischerweise also des Chemotherapeutikums, zu bestimmen. Ein Vergleich der Stoffwechselaktivität von nicht behandelten Tumorzellen mit der Stoffwechselaktivität von therapeutisch behandelten Tumorzellen lässt dann die Wirksamkeit der Therapie anhand der verringerten Stoffwechselaktivität der behandelten Zelle im Vergleich zur unbehandelten Tumorzelle, direkt bestimmen. Auf diese Weise wäre es möglich innerhalb kürzester Zeit bei einem bestimmten Tumor festzustellen, welche Therapie geeignet oder weniger geeignet ist zur Behandlung des Patienten.

20

25

30

Ein entscheidendes Problem für ein derartiges Verfahren ist es jedoch, in der Zellsuspension die Bedingungen so einzustellen, dass die vereinzelter Tumorzellen eine maximale Stoffwechselaktivität entfalten können. Erst dadurch kann eine Verringerung der Stoffwechselaktivität noch mit ausreichender Genauigkeit gemessen werden. Aus einem kompakten Tumorgewebe durch enzymatischen Verdau hergestellte

Einzelzellsuspensionen der Tumorzellen weisen jedoch in den bekannten Medien äußerst geringe Stoffwechselaktivitäten auf, sodass es nur sehr schwer oder gar nicht möglich ist, eine weitere Verringerung der Stoffwechselaktivität mit hinreichender Genauigkeit zu bestimmen.

5

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Zellkulturmedium zur Verfügung zu stellen, welches auf diese Weise hergestellten Einzelzellsuspensionen von Tumoren eine maximale Stoffwechselaktivität und Lebensdauer zu verleihen und ein Verfahren zur Beurteilung einer Tumorthherapie mit diesem Medium zu schaffen.

10

Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Medium zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie an Einzelzellsuspensionen enthaltend die essenziellen Aminosäuren, Vitamine, Salze und Kohlenstoffdonatoren, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium 0,1 bis 1 mM Puffer pH 7,0 bis 7,4, 2 bis 10 g/l Glucose und 2 bis 5 mM Glutamin als Kohlenstoffquellen und 5 bis 20 % fötales Kälberserum enthält.

15

20

Von bekannten Medien unterscheidet sich das erfindungsgemäße Medium durch eine sehr geringe Pufferkapazität, einen höheren Gehalt an Glucose, Glutamin und fötalem Kälberserum. Andere Kohlenstoffquellen außer Glucose und Glutamin und weitere Puffer enthält das Medium vorzugsweise nicht.

25

30

Die Zusammensetzung des erfindungsgemäßen Mediums richtet sich in gewissem Maße nach den metabolischen Eigenschaften der in dem untersuchten Tumor enthaltenen Zellen. Die Einstellung der Variablen im erfindungsgemäßen Medium strebt dabei an für die Tumorzellen die Bedingungen der Glycolyse einzustellen, da hierbei eine hohe pH-Wert-Änderung zu erwarten ist. Gleichzeitig sollen die in der Suspension unvermeidlicherweise ebenfalls enthaltenen normalen Zellen nach

Möglichkeit im aeroben Metabolismus gehalten werden und dadurch eine vernachlässigbar geringe Wirkung auf den pH-Wert ausüben.

Das erfindungsgemäße Medium kann durch Aufbau aus den Komponenten hergestellt werden. Beispielsweise können übliche Vitaminmischungen und Proteinhydrolysate als Quelle der essenziellen Aminosäuren mit den oben genannten essenziellen Mengen an Glucose, Glutamin, Puffer und fötalem Kälberserum aufgebaut werden. Alternativ kann auch von bekannten Medien ausgegangen und deren Zusammensetzung durch Zugabe der wichtigen Mengen an essenziellen Bestandteilen wie oben erläutert, ergänzt werden. Insbesondere eignet sich hierzu das RUN-Medium als Ausgangsbasis. Ferner kann das Medium Antibiotika enthalten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie an Einzelzellsuspensionen von Tumorzellen durch Vergleich der Säurebildung in einem Medium bei therapierten und nicht therapierten Tumorzellen, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man die Messung in einem Medium wie vorstehend beschrieben durchführt. Das Verfahren eignet sich gut zur Durchführung unter Verwendung handelsüblicher Vorrichtungen wie beispielsweise dem Cytosensor®-Mikrophysiometer der Firma Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA., USA, ist aber nicht hierauf beschränkt.

Letztere Vorrichtung und deren Verwendung zur Analyse von Zellmembran- gebundenen Rezeptoren ist aus Biosensors & Bioelectronics 15 (2000) 149-158 bekannt, wobei die durch die physiologischen Effekte solcher Rezeptoren hervorgerufenen pH-Änderungen gemessen werden als Maß für die metabolischen Effekte.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie wird nachfolgend beispielsweise unter Verwendung des Cytosensor®-Mikrophysiometers beschrieben.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung des erfindungsgemäßen Mediums wird eine Probe des zu untersuchenden Tumors entnommen und in bekannter Weise durch enzymatischen Verdau in eine Einzelzellensuspension überführt. Die Zellen werden aus dem Verdaumedium abgetrennt und dann deren pH-Kurve in dem erfindungsgemäßen Medium aufgenommen. Ein typisches Medium gemäß der Erfindung weist z.B. die aus der nachstehenden Tabelle 1 zu entnehmende Zusammensetzung auf.

Tabelle 1

10

Konzentration
mg/l

Substanz

15

4,45

Alanin, L-

147,5

Arginin L-, HCL

7,5

Asparagin, L-, H2O

6,65

Asparaginsäure, L-

24

Cystin, L-

17,56

Cystein, L-, HCL, H2O

20

7,35

Glutaminsäure, L-

18,75

Glycin

31,48

Histidin, L-, HCl H2O

20

Hydroxyprolin, L-4-

54,45

Isoleucin, L-

25

59,05

Leucin, L-

91,25

Lysin, L-HCl

17,24

Methionin, L-

35,48

Phenylalanin, L-

17,25

Prolin, L-

30

26,25

Serin, L-

53,45

Threonin, L-

9,02

Tryptophan, L-

| | | |
|----|--------------|--------------------------------------|
| | 38,7 | Tyrosin, L- |
| | 52,85 | Valin, L- |
| | 2000 | D + Glucose |
| | 12,6 | Inosit, myo-, inosit, meso- |
| 5 | 0,00365 | Biotin, D- |
| | 2,24 | Calcium D-Pantothenat |
| | 8,98 | Cholinchlorid |
| | 1 | Glutathion, L-, reduziert |
| | 2,02 | Nicotinsäureamid |
| 10 | 2,031 | Pyridoxin, HCL |
| | 2,17 | Thiaminchlorid, Thiamin HCL |
| | 0,01 | Tocopherolsuccinat DL-alfa |
| | 0,1 | Vitamin A-acetat |
| | 0,68 | Vitamin B 12 (Cyanocobalamin) |
| 15 | 2 | Vitamin C (Ascorbinsäure) |
| | 0,1 | Vitamin D2 |
| | 8,1 | Phenolrot |
| | 154 | Calciumchlorid 2 H2O |
| | 0,05 | Eisen (III) nitrat, 9 H2O |
| 20 | 0,417 | Eisen (II) Sulfat, 7 H2O zur Analyse |
| | 311,8 | Kaliumchlorid |
| | 0,00125 | Kupfer (II) sulfat, 5 H2O |
| | 100 | Magnesiumsulfat, 7 H2O |
| | 61 | Magnesiumchlorid, 6 H2O |
| 25 | 6999,5 | Natriumchlorid |
| | 14,2 | di-Natriumhydrogenphosphat (anhyd.) |
| | 0,43 | Zinksulfat, 7 H2O |
| | 2 mM | Glutamin |
| | 10 Vol.-% | fötales Kälberserum |
| 30 | 100 Units/ml | Penicillin |
| | 100 µg/ml | Streptomycin |
| | 100 µg/ml | Kanamycin |

2,5 µg/ml

Fungizone

Hierzu werden die so erhaltenen Einzelzellen dann vorzugsweise auf einer pH-Elektrode immobilisiert. Die Immobilisierung kann durch geeignete Substanzen wie sie in der Zellkultur üblich sind, erfolgen. Als gut geeignet hat sich Agarose herausgestellt, welches die gewonnen Einzelzellen auf der Elektrodenoberfläche immobilisieren kann aber auch andere in der Zellkultur verwendete Immobilisierungsmittel sind brauchbar.

Das verwendete Gerät weist acht Kanäle auf, in denen simultan der pH-Wert in Durchflusszellen bestimmt werden kann. In jedem Kanal ist eine pH-Elektrode angeordnet, auf der sich die immobilisierte Zellsuspension befindet. Über diese immobilisierte Zellsuspension wird dann durch eine Pumpe für einen geeigneten Zeitraum das erfindungsgemäße Medium gepumpt und gleichzeitig mit der pH-Messung begonnen. In einem typischen Fall dauert ein Messzyklus 120 Sekunden. Davon wird 90 Sekunden lang nur Medium zugepumpt und jede Sekunde ein pH-Wert bestimmt. Danach wird über 30 Sekunden die pH-Wert-Änderung gemessen. Dieser Vorgang wird über einen längeren Zeitraum, in der Regel 14 bis 24 Stunden, fortgesetzt, sodass sich schließlich eine pH-Wert-Kurve ergibt, welche der metabolischen Aktivität der immobilisierten Zellen direkt äquivalent ist.

Im oben angegebenen Gerät finden sich wie oben erwähnt, acht parallele Kanäle. Zur Bestimmung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie wird zweckmäßig in einem Kanal zur Bestimmung einer Basismesskurve nur erfindungsgemäßes Medium durchgepumpt, in den anderen Kanälen können verschiedene Antitumormittel (Cytostatika) gleichzeitig bestimmt werden. Da die Cytostatika, wenn sie gegenüber den hier verwendeten Tumorzellen eine Wirksamkeit entfalten, zu einer Herabsetzung der metabolischen Aktivität führen, erhält man eine pH-Wert-Kurve über die Zeit, welche in Folge der verringerten metabolischen Aktivität durch die

Cytostatikaeinwirkung eine geringere pH-Wert-Änderung zur Folge hat. Aus dem Vergleich der Kurvenneigungen, die dann bei den in Gegenwart von Cytostatika gemessenen Kurven im Vergleich zu der Cytostatika-freien Messkurve gewonnen werden, lässt sich direkt die Aktivität der jeweils untersuchten cytotatisch wirksamen Verbindungen bestimmen. In gleicher Weise ist es auch möglich, nicht in den verschiedenen Kanälen verschiedene cytotatisch oder cytotoxisch wirksamen Verbindungen zu untersuchen sondern für ein bestimmtes Cytostatikum unterschiedliche Konzentrationen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zu untersuchen. Letztere Ausführungsform hat den Vorteil, dass evtl. Einflüsse des untersuchten Cytostatikums auf den pH-Wert durch Anpassung des Mediums im Rahmen der erfindungsgemäßen Grenzwerte insbesondere hinsichtlich der Pufferkapazität ausgeglichen werden können. Die Pufferkapazität als solche wird möglichst gering gehalten, darf jedoch 0,1 mM nicht unterschreiten. Vorzugsweise wird die Puffermenge möglichst nahe an diesem unteren Grenzwert eingestellt. Bei Cytostatika, die selbst den pH-Wert beeinflussen können, kann jedoch dann die Puffermenge erhöht werden bis maximal 1 mM.

Erfindungsgemäß wird es möglich, innerhalb sehr kurzer Zeit die Wirksamkeit einer Tumorthherapie bei einem Patienten extrakorporal zu messen und aufgrund der Messergebnisse dann die Behandlung entsprechend einzustellen. Damit wird nicht nur ein entscheidender Zeitgewinn bei der Behandlung des Patienten ermöglicht sondern auch das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen der Therapie ohne entsprechende Wirksamkeit gegenüber dem Tumor selbst verringert oder ganz vermieden. Dies bedingt einen erheblichen Fortschritt bei der Tumorthherapie.

Ansprüche

- 5 1. Medium zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie an Einzelzellsuspensionen, enthaltend die essenziellen Aminosäuren, Vitamine, Salze und Kohlenstoffdonatoren,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass das Medium 0,1 bis 1 mM Puffer pH 7,0 bis 7,4, 2 bis 10 g/l Glucose, 2 bis 5 mM Glutamin als Kohlenstoffquelle und 5 bis 20 % Vol.-% fötales Kälberserum enthält.
- 10 2. Medium nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass es als Puffer Phosphatpuffer enthält.
- 15 3. Medium nach Anspruch 1 oder 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass es 8 bis 12 Vol.-% fötales Kälberserum enthält.
- 20 4. Verfahren zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie an Einzelzellsuspensionen von Tumorzellen durch Bestimmung der Säurebildung in einem Medium in Gegenwart und in Abwesenheit einer cytostatisch oder cytotoxisch wirkamen Substanz,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
25 dass man die Messung in einem Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 3 durchführt.
- 30 5. Verfahren nach Anspruch 4,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass man die Messung mittels einer pH-Elektrode, auf welcher die Einzelzellsuspension immobilisiert ist, durchführt unter Verwendung

einer Durchflussszelle, welche von dem erfindungsgemäßen Medium durchströmt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5,

5

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

dass man das Medium durch die Durchflussszelle pumpt bis sich ein konstanter pH-Wert eingestellt hat und dann durch Messung in kurzen Abständen die Änderung des pH-Wertes bei stehendem Medium misst, das Medium danach aus der Messzelle entfernt und mit dem Messzyklus solange wieder von vorne beginnt, bis man die pH-Wert-Änderung über einen längeren Zeitraum bestimmt hat.

10

7. Verfahren nach Anspruch 6,

15

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

dass man das Medium 1 1/2 bis 2 1/2 Minuten lang zuführt und misst und dann mit frischem Medium den Vorgang 14 bis 24 Stunden lang wiederholt.

8. Verfahren nach Anspruch 7,

20

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

dass man das Verfahren in einem Mehrkanalgerät durchführt, wobei ein Kanal von Medium ohne Cytostatikum beschickt wird und die anderen Kanäle mit dem gleichen Medium, welches das zu untersuchende Cytostatikum enthält, beschickt werden.

25